

ISSN 1348-4656

金沢大学自然計測応用研究センター

臨海実験施設

研究概要・年次報告 第1号

2002.4 ~ 2003.3



Annual Report of Noto Marine Laboratory
Institute of Nature and Environmental Technology, Kanazawa University

表紙デザイン：エコテクノロジー研究部門 小林史尚 助手

兼六園の徽軫（ことじ）灯籠は「金沢（大学）」、背景の白山は「自然」、兼六園の日本最古といわれる噴水は「計測」を表している。

活 動 報 告

* 研究概要-----2

* 研究業績-----4

* 研究発表及び研究活動-----5

* 研究費-----7

* 利用状況-----8

【研究概要】

本年は当部門の笹山と又多および当部門の協力教官である福森（理学部生物学科）が、有鬚動物門 *Oligobrachia* 属のマシコヒゲムシの研究について大きな進展をみせた。ヒゲムシ類は口も消化管も持たず、体内に化学合成細菌を共生させている特異な生物である。3人は、これまでこの属ではまったく知られていなかったマシコヒゲムシの終体部（opisthosoma）を含む全長の採集に世界で初めて成功した。いままでに世界で100種を超えるヒゲムシが発見されているが、終端部まで採れているのは10種強である。本種の終体部の基本的な形態は他の属のそれに似ているが、より体節数が多いように見えるが、現在、詳細に研究中である。その過程において、読売新聞、北陸中日新聞また北国新聞から終体部が採集されたことについて報道がなされた。また、笹山は、本種の水平横断の顕微鏡標本を作り、共生細菌が体のどこにいるかを見出し、その位置を後体部に特定した。上記の事実は複数の論文として国際誌に投稿すべく現在、執筆中である。

ミサキギボシムシは、半索動物門に属する動物で脊椎動物の遠い先祖に当たると考えられているが、その生殖行動は解明されていない。これは本種が海底の砂の中に坑道を掘り、その中で全ての生活が営まれるからである。当部門の大学院前期過程1年の小木曾正造君は、近接する石川県のと海洋ふれあいセンターの坂井課長と福島技師、並びに当施設技官の又多氏の協力を得て、昨年が続いて本年もガラス水槽の中で成熟個体の雌雄ともに生殖行動の観察に成功した。これらはビデオに記録され本年、金沢大学で開催された第73回日本動物学会において発表された。これも国際誌に投稿を準備中である。

大学院後期課程の戒田典久君（石川県水産総合センター技師）は、今年最終学年に達し、研究をまとめた。その内容は研究報告に詳しい。氏の研究は真骨魚類のCa代謝をカルシトニンというホルモンの観点から明らかにするもので、自分が継代飼育し、遺伝子を均一にしたオニオコゼを用い、非常に難易度の高い手術を行ったところに特徴がある。その結果、氏は血中のCa濃度と血中カルシトニン濃度が、その現象の始まりから終りまで関連して動くことを世界で初めて明らかにし、学位を取得した。

笹山は、文部科学省の平成14年度創造開発研究調査旅費により、11月にほぼ一ヶ月間、タイ王国へ赴き、バンコクにあるスリナカリンウィロット大学の準教授Wichian, M. 先生とともにメダカの性

比について調査した。その結果、タイ国においても5調査地点のうち3地点において、恐らく内分泌攪乱物質によって性比がオス1に対して最高メス5の割合に変化していることが知られた。本結果をまとめて国際誌に発表予定である。

一方、鈴木は生理作用の多様性を研究している。まず、海産魚のヒラメの骨代謝に関係するホルモンレセプター（カルシトニンレセプター、カルシトニン遺伝子関連ペプチドレセプター及びビタミンDレセプター）に注目し、これらのレセプターのクローニングに魚で初めて成功した（Suzuki *et al.*, *Gene*, 244: 81-88, 2000; Suzuki *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270, 2000）。特にヒトにおいて、血管拡張作用があり、心筋梗塞の治療に使用されているカルシトニン遺伝子関連ペプチドは、そのレセプターの発現を調べた結果、ヒラメでは海水適応に関係していることが判明した(Suzuki *et al.*, *Fisheries Sci.*, 68: 425-429, 2002)。

さらに鈴木は、内分泌攪乱物質や重金属などの環境汚染物質に対する系を開発した。これは、ウロコの特徴を生かしたアッセイ系である（Suzuki *et al.*, *Peptides*, 21: 115-124, 2000; Suzuki and Hattori, *J. Pineal Res.*, 33: 253-258, 2002）。魚の脊椎骨は無細胞であり、魚は脊椎骨ではなく、ウロコからカルシウムを出し入れおり、ウロコはヒトの脊椎骨を薄く輪切りにした構造をしている。したがって、ウロコをヒトの脊椎骨のモデルとして利用可能である。そこでまず、今年度は海産魚類よりも反応性がよいキンギョのウロコを用いて調べた（研究報告参照）。この系を用いることで、内分泌攪乱物質であるビスフェノールAは生殖以外にも骨代謝に悪影響を与えることを明らかにした。これは、脊椎動物を通して初めての報告である。さらに重金属の1種であるカドミウムを 10^{-13} Mという非常に高感度で検出でき、腎障害を経て間接的に骨に作用すると考えられていたカドミウムが直接的に骨に作用することもわかった。なお、内分泌攪乱物質については、*Life Sciences*に投稿中であり、カドミウムについては、平成15年度の水産学会で報告し、*Biochem. Biophys. Res. Commun.*に投稿する予定である。今後は、様々な海産魚類の環境汚染物質に対する影響を調べ、その多様性を追求して行く予定である。

【研究業績】

1) 学術論文

- (1) Sasayama, Y., Takei, Y., Hasegawa, S. and Suzuki, D.: Direct raises in blood Ca levels by infusing a high-Ca solution into the blood stream accelerate the secretion of calcitonin from the ultimobranchial gland in eels. *Zool. Sci.*, 19, 1039-1043 (2002)
- (2) Suzuki, N., Suzuki, T. and Kurokawa, T.: Possible involvement of calcitonin gene-related peptide in seawater adaptation of flounder: Expression analysis of its receptor mRNA in the gill. *Fisheries Sci.*, 68, 425-429 (2002)
- (3) Suzuki, N. and Hattori, A.: Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. *J. Pineal Res.*, 32, 253-258 (2002)
- (4) Srivastav, A.K., Tiwari, P.R., Srivastav, S.K. and Suzuki, N.: Responses of ultimobranchial gland to vitamin D₃ treatment in freshwater mud eel, *Amphipnous cuchia* kept in different calcium environments. *Anat. Histol. Embryol.*, 31, 257-261 (2002)
- (5) Sasayama, Y. and Takeuchi, A.: Reproductive strategy of the tiny abyssal scallop (*Delectopecten vitreus macrocheiricolus*) collected on the bottom of the Japan Sea, surmised from histological observations of the gonads. *Zool. Sci.*, in press
- (6) Kimura, H., Sato, M., Sasayama, Y. and Naganuma, T.: Molecular characterization and *in situ* localization of endosymbiotic 16SrRNA and RuBisCO genes in the pogonophoran tissue. *Marine Biotech.*, in press
- (7) Kaida, N. and Sasayama, Y.: Dynamics of plasma Ca and calcitonin levels in stonefish (*Inimicus japonicus*) administered a high-Ca solution into the stomach. *Zool. Sci.*, in press
- (8) Suzuki, N., Kambegawa, A. and Hattori, A.: Bisphenol A influences the plasma calcium level and inhibits calcitonin secretion in goldfish. *Zool. Sci.*, in press
- (9) Yaoi, Y., Suzuki, M., Tomura, H., Sasayama, Y., Kikuyama, S. and Tanaka, S.: Molecular cloning and expression regulation of otoconin-22 in the bullfrog endolymphatic sac by ultimobranchial calcitonin. *Endocrinology*, in press

2) 著書

- (1) 笹山雄一, 鈴木信雄 「カルシトニン」 『新ホルモンハンドブック』
日本比較内分泌学会編, 南江堂, 印刷中

【研究発表及び研究活動】

1) 研究発表

- (1) 戒田典久, 笹山雄一: オニオコゼ2倍体および3倍体の血漿Ca濃度に及ぼす経口的Ca負荷の影響, 平成14年度日本水産学会大会, 奈良 (2002, 4)
- (2) 戒田典久: 蛍光染色剤を用いたオニオコゼ受精卵の核および染色体の挙動, 平成14年度日本水産学会大会, 奈良 (2002, 4)
- (3) 鈴木信雄, 服部淳彦: キンギョのウロコに存在する破骨細胞及び骨芽細胞に対するメラトニンの作用, 第73回日本動物学会, 金沢 (2002, 9), Zool. Sci., 19, 1485 (2002)
- (4) 佐野亜季実, 椿智洋, 花園誠, 鈴木信雄, 服部淳彦: ニワトリ破骨および骨芽細胞に対するメラトニンの作用を調べる培養系の確立とその効果, 第73回日本動物学会, 金沢 (2002, 9), Zool. Sci., 19, 1485 (2002)
- (5) 戒田典久, 笹山雄一: 2種の高産真骨魚類, オニオコゼとメジナの消化管前方部におけるCaのhandlingについて, 第73回日本動物学会, 金沢 (2002, 9), Zool. Sci., 19, 1495 (2002)
- (6) 矢追雄一, 鈴木雅一, 戸村秀明, 笹山雄一, 菊山栄, 田中滋康: ウシガエル内リンパ囊におけるカルシトニンによるotoconin-22 mRNAの発現調節, 第73回日本動物学会, 金沢 (2002, 9), Zool. Sci., 19, 1495 (2002)
- (7) 小木曾正造, 坂井恵一, 福島広行, 又多政博, 笹山雄一: ミサキギボシムシ (*Balanoglossus misakiensis*) の放卵・放精行動, 第73回日本動物学会, 金沢 (2002, 9), Zool. Sci., 19, 1501 (2002)
- (8) 鈴木信雄, 佐野亜季実, 花園誠, 服部淳彦: キンギョのウロコを用いたアッセイ系の開発と骨代謝に関与するホルモンの作用, 第27回日本比較内分泌学会, 岡山 (2002, 11), Proc. Jap. Soc. Comp. Endocrinol., 17, 94 (2002)
- (9) 矢追雄一, 鈴木雅一, 戸村秀明, 倉淵真吾, 笹山雄一, 菊山栄, 田中滋康: ウシガエルの鰓後腺におけるプロホルモン転換酵素PC1とPC2の遺伝子の発現, 第27回日本比較内分泌学会, 岡山 (2002, 11), Proc. Jap. Soc. Comp. Endocrinol., 17, 96 (2002)

2) 研究交流

海外渡航

- (1) 笹山雄一，タイ王国スリナカリンウイロット大学，メダカを環境指標に用いた農薬汚染の実態に関する調査研究（2002, 11）

3) 各種活動

学会活動

- (1) 笹山雄一：日本動物学会評議員
- (2) 笹山雄一：第73回日本動物学会総括責任者（2002, 9）
- (3) 鈴木信雄：第73回日本動物学会庶務幹事（2002, 9）

社会活動

- (1) 笹山雄一：講演「遺伝子と生物多様性」，石川自然談話会，
のと海洋ふれあいセンター（2003, 2）
- (2) 笹山雄一，小村和久：公開講座「海と空を知る」，
臨海実験施設（2003, 3）

【研究費】

1) 科学研究費

- (1) 鈴木信雄（代表），若手研究B，重金属及び内分泌攪乱物質の骨代謝に及ぼす作用：

骨硬化ホルモンとのクロストーク，2,400千円

2) その他

- (1) 笹山雄一（代表），平成14年度文部科学省在外研究員（創造開発研究）調査費，メダカを環境使

用に用いた農薬汚染の実態に関する調査研究，700千円

- (2) 笹山雄一（代表），平成14年度重点化経費（地域貢献），海と空を知る：生物多様性と環境放射

線を調べる，600千円

- (3) 鈴木信雄（代表），平成14年度重点化経費（若手教官の萌芽的研究），骨形成のメカニズムの解

明：魚類のウロコの再生を利用したアッセイの確立，890千円

- (4) 笹山雄一（GBIF分担），平成14年度科学事業振興事業団，無脊椎動物の生理機能の多様性に関す

るデータベースの開発，800千円

- (5) 笹山雄一（分担）：21世紀COEプログラム，環日本海域の環境計測と長期・短期変動予測，日

本海に生息する特徴ある海産無脊椎動物の生活様式の解明：ヒゲムシを例にして，1,500千円

- (6) 笹山雄一（代表）：平成14年度学長裁量経費（教育研究環境整備経費），臨海実験施設小型動力

船の更新，6,300千円

【利用状況】

1) 利用者及び研究目的

- | | |
|-----------------|---|
| 4 / 15 ~ 4 / 18 | 東京大学海洋研究所
小松輝久 助教授 他1名
「九十九湾藻場音響調査」 |
| 4 / 23 ~ 4 / 25 | 金沢大学自然科学研究科 博士前期課程1年
舟本冴子 他1名
「九十九湾でのキクメイシモドキの生態調査」 |
| 5 / 29 ~ 6 / 1 | 京都大学農学研究科 博士後期課程2年
甲斐嘉晃 他1名
「標本採集のため」 |
| 6 / 27 ~ 6 / 29 | 神奈川大学理学部 応用生物科学科4年
峯岸孝彰
「海生生物のミネラル代謝についての共同研究」 |
| 7 / 16 ~ 7 / 23 | 金沢大学自然科学研究科 博士前期課程1年
舟本冴子
「九十九湾でのキクメイシモドキの生態調査」 |
| 7 / 26 ~ 7 / 27 | 金沢大学理学部
福森義宏 教授
「海産無脊椎生物多様性研究に係る資料収集」 |
| 7 / 26 ~ 7 / 27 | 広島大学大学院理学研究科
道端齊 教授 他1名
「海産無脊椎生物多様性研究に係る資料収集」 |
| 9 / 1 ~ 9 / 6 | 金沢大学自然科学研究科 博士前期課程1年
舟本冴子 他1名
「九十九湾でのキクメイシモドキの生態調査」 |
| 9 / 14 ~ 9 / 15 | (財) 金沢子ども科学財団
清水弘 他12名 |

- 9/18～9/20 富山大学人文学部
中井精一 助教授 他27名
「能登半島における海洋生物に関する社会・自然環境的研究」
- 9/26～9/27 福井市自然史博物館
石田惣
「標本採集」
- 9/27～9/28 旭川医科大学
春見達郎 助手
「研究打ち合わせ」
- 9/30～10/4 京都大学総合博物館
伊勢戸徹
「内肛動物の採集」
- 10/16 のと海洋ふれあいセンター
東出幸真 普及課技師 他1名
「海産生物の調査」
- 10/31 のと海洋ふれあいセンター
達克幸 普及課主任技師
「海産生物の採集」
- 11/15 のと海洋ふれあいセンター
東出幸真 普及課技師 他1名
「海産生物の調査」
- 12/12 のと海洋ふれあいセンター
東出幸真 普及課技師 他1名
「海産生物の調査」
- 12/18 のと海洋ふれあいセンター
達克幸 普及課主任技師
「海産生物の採集」
- 1/10 のと海洋ふれあいセンター
坂井恵一 普及課長
「海産生物の調査」

- 1 / 14 ~ 1 / 17 富山大学人文学部
中井精一 助教授 他 28 名
「能登半島における海洋生物に関する社会・自然環境的研究」
- 1 / 15 のと海洋ふれあいセンター
東出幸真 普及課技師 他 1 名
「海産生物の調査」
- 1 / 29 のと海洋ふれあいセンター
達克幸 普及課主任技師
「海産生物の採集」
- 2 / 12 のと海洋ふれあいセンター
東出幸真 普及課技師 他 1 名
「海産生物の調査」
- 2 / 15 のと海洋ふれあいセンター
坂井恵一 普及課長
「海産生物の調査」
- 3 / 3 ~ 3 / 5 北海道大学北方生物圏フィールド科学センター
鈴木範男 教授
「研究打ち合わせ」
- 3 / 6 ~ 3 / 8 帝京大学バイオサイエンス学科
三田雅敏 助教授 他 1 名
「ヒゲムシの採集」
- 3 / 12 のと海洋ふれあいセンター
東出幸真 普及課技師
「海産生物の採集」
- 3 / 26 ~ 3 / 28 京都大学農学研究科 博士後期課程2年
甲斐嘉晃 他 1 名
「標本採集のため」

2) 臨海実習等

- 7 / 9 ~ 7 / 11 富山県立砺波高校
清玄寺吉郎 教諭
他 4 1 名
「ウニの初期発生の研究・磯の生物調査」
- 8 / 7 ~ 8 / 9 金沢大学医学部
長井雅子 教授
他 3 4 名
「生命科学実験」
- 8 / 18 ~ 8 / 24 公開臨海実習
信州大学理学部生物科学科2年
藤田智司
他 2 1 名
- 8 / 26 ~ 8 / 31 富山大学理学部
小松美英子 教授
他 1 9 名
「臨海実習」
- 9 / 2 ~ 9 / 4 金沢大学理学部
矢島孝昭 教授
他 2 4 名
「生物学実習」
- 10 / 19 ~ 10 / 20 公開講座
金沢大学理学部
石田健一郎 講師
他 4 名
- 3 / 29 ~ 3 / 30 公開講座
金沢大学自然計測応用研究センター
低レベル放射能実験施設
小村和久 教授
他 1 3 名

3) 利用者数及び船舶の使用状況

平成14年度臨海実験施設利用者数（延べ人数2, 135人の内訳）

(月)	研究者		学生	
	学内	学外	学内	学外
4	0	8	75	0
5	0	0	93	8
6	0	0	90	3
7	2	10	101	120
8	6	12	318	262
9	3	10	174	105
10	2	16	93	0
11	0	2	90	0
12	0	3	123	0
1	0	8	93	112
2	0	3	84	0
3	6	7	62	31
合計	19	79	1,396	641

平成14年度臨海実験施設船舶使用回数

(月)	あおさぎ	くろさぎ ^{注)}
4	4	3
5	4	4
6	3	3
7	3	2
8	6	4
9	3	5
10	5	2
11	5	4
12	2	4
1	3	3
2	4	4
3	5	10
合計	47	48

注) くろさぎは平成14年度学長裁量経費により更新された。

研 究 報 告

- * ビスフェノールAはキンギョのウロコの破骨及び骨芽細胞の活性を抑制する (p 14-15)

Bisphenol A suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish

- * ウロコの破骨細胞及び骨芽細胞に対するカドミウムの作用 (p 16-17)

The effects of cadmium on osteoclasts and osteoblasts in the scales of goldfish

- * 真骨魚類の軟骨におけるカルシトニンmRNAの発現 (p 18-19)

Expression of *calcitonin* mRNA in the cartilage of teleosts

- * オニオコゼにおけるカルシウムホメオスタシスの内分泌的調節

— 特にカルシトニンの役割に関して — (p 20-21)

Endocrine regulation of calcium homeostasis in the stonefish, *Inimicus japonicus*: with special references to the role of calcitonin

ビスフェノールAはキンギョのウロコの破骨及び骨芽細胞の活性を抑制する

鈴木信雄

〒927-0553 珠洲郡内浦町小木 金沢大学自然計測研究応用センター, 臨海実験施設

Nobuo Suzuki: Bisphenol A suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish

ビスフェノールAは、主としてポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料として使用され、食品の包装等に広く用いられている。最近、この物質は女性ホルモンであるエストロゲンのレセプターと結合し、エストロゲン様の作用を持ち、生殖を攪乱することがわかってきた。エストロゲンは骨にも作用するので、ビスフェノールAも骨代謝に影響を与えている可能性がある。

一方、骨を壊す細胞である破骨細胞と骨を作る細胞である骨芽細胞を共存させて培養することは難しい。これまでの骨代謝に関する研究は、それぞれの細胞を単独で培養し、ホルモン等に対する作用を調べられてきた。また破骨細胞が分化するには、骨芽細胞との相互作用が必要であることが最近明らかになってきた。両方の細胞を共存させて培養しなければ、これらの骨細胞に対する作用を正確に評価できないと考えられる。そこで私は、魚のウロコに注目した。

大部分の魚の脊椎骨は無細胞であり、ウロコからカルシウムを出し入れしている。ウロコには破骨及び骨芽細胞が共存し、ヒトの脊椎骨を薄く輪切りにしたような構造をしている。したがって、ウロコはヒトの脊椎骨のモデルになり、ビスフェノールA等の環境汚染物質の骨代謝に対する影響を評価できる可能性が高い。そこで、ウロコのアッセイ系を開発し、ビスフェノールAの骨細胞に対する作用を調べた。

キンギョのメス（体重30g前後）をMS222（Aldrich）で麻酔し、ウロコを採取した。そのウロコを1%の抗生物質を含むイーグルスの最少培地（大日本製薬）で2度洗浄した。その後ビスフェノールA（ 10^{-7} ~ 10^{-5} M）を含む培地で培養（15°C, 6時間）し、無添加のコントロールと比較した。同様にキンギョのメス（体重30g前後）からウロコを採取し、エストロゲン（ 10^{-7} ~ 10^{-5} M）を含む培地で培養し、無添加のコントロールと比較した。なお、ウロコは各培地に8枚ずつ入れ、その破骨及び骨芽細胞の活性を測定した。

本研究では、破骨細胞の活性として酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ（TRACP）を用い、骨芽細胞の活性の指標としてアルカリフォスファターゼ（ALP）を使用し、ビスフェノールAの骨細胞に対する作用を評価した。これらはフォスファターゼなので基質としてパラニトロフェノールリン酸を用い、緩衝液の組成を変えることで測定可能である。本研究では、TRACP及びALP用の緩衝液として、それぞれ酒石酸（10mM）を含む0.1M酢酸緩衝液（pH5.3）及び塩化マグネシウム（1mM）を含む0.1Mトリス緩衝液（pH9.5）を用いた。

培養後、10%ホルマリンを含む0.05Mカコジル酸緩衝液（pH7.4）でウロコを固定し、蒸留水で洗浄し、0.05Mカコジル酸緩衝液（pH7.4）で保存（4°C）した。その後、ウロコの重量を測定し、96穴のマイクロプレートにウロコを入れ、そのウェルに前述の基質（10mM）を含む緩衝液（200µl）を入れ、インキュベートした（25°C, 1時間）。反応は2N水酸化ナトリウム（50µl）を加えることで停止し、そのウェルから150µlとり、別のマイクロプレートに移した。その後、マイクロプレートリーダーで測定（405nm）し、その吸光度からパラニトロフェノール量をあらかじめ作成しておいた標準曲線により求めた。

TRACP活性は、エストロゲンを添加すると、無添加のコントロール（5.2 nmol pNP produced x (mg

scale x h⁻¹) と比較して、10⁻⁷及び10⁻⁶ Mで有意に上昇した (6.2 nmol pNP produced x (mg scale x h)⁻¹, $P < 0.05$; 6.9 nmol pNP produced x (mg scale x h)⁻¹, $P < 0.01$) (Fig. 1)。一方、ビスフェノールA (10⁻⁵ M) を添加すると逆にその活性は低下し、無添加のコントロール (3.3 nmol pNP produced x (mg scale x h)⁻¹) よりも、低い値を示した (2.9 nmol pNP produced x (mg scale x h)⁻¹, $P < 0.01$) (Fig. 1)。

ALPもエストロゲン (10⁻⁵ M) により上昇し (コントロール: 2.9 nmol pNP produced x (mg scale x h)⁻¹; エストロゲン 4.1 nmol pNP produced x (mg scale x h)⁻¹, $P < 0.05$)、ビスフェノールA (10⁻⁵ M) により低下した (コントロール: 3.7 nmol pNP produced x (mg scale x h)⁻¹; ビスフェノールA: 2.9 nmol pNP produced x (mg scale x h)⁻¹, $P < 0.05$) (Fig. 2)。

以上のことから、ビスフェノールAの骨細胞に対する作用はエストロゲンと異なっており、骨代謝に悪影響を与えていることが判明した。ビスフェノールAの骨細胞に対する作用を明らかにしたのは、本研究が初めてであり、その機構の詳細を調べていきたい。

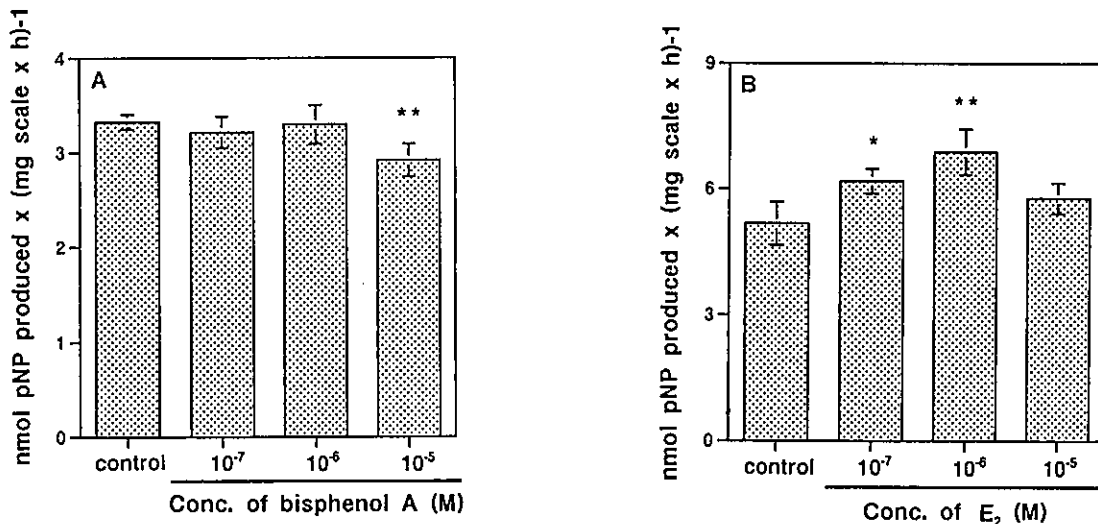


Fig. 1 Effects of bisphenol A (A) and estrogen (E₂) (B) on TRACP activities in the cultured scales at 6 h. Values are means±SEM. *, ** indicate statistically significant differences at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively, compared with the values in the control scales.

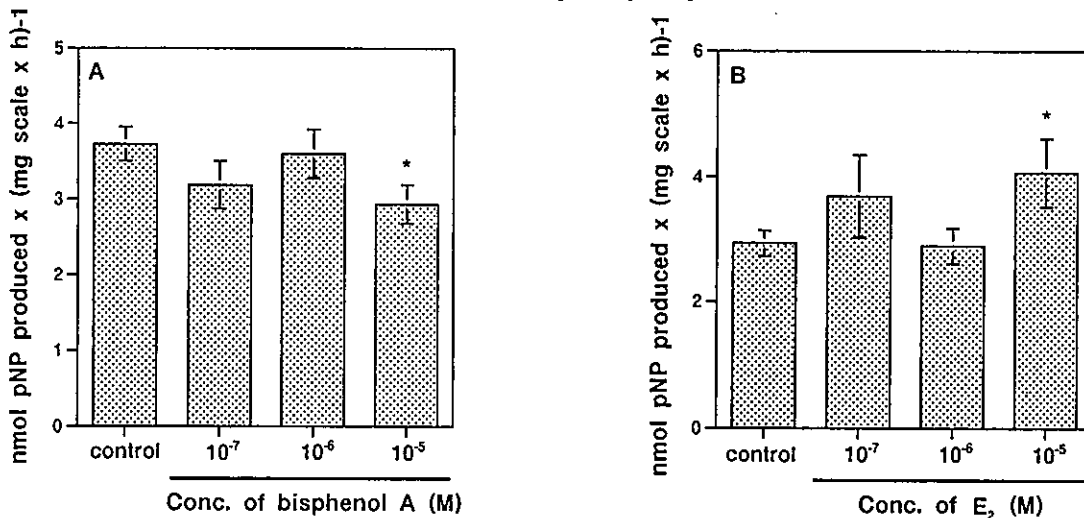


Fig. 2 Effects of bisphenol A (A) and estrogen (E₂) (B) on ALP activities in the cultured scales at 6 h. Values are means±SEM. * indicates a statistically significant difference at $P < 0.05$, compared with the values in the control scales.

謝辞

本研究は科学研究費，若手研究B (14740455) の援助により行われた。

ウロコの破骨細胞及び骨芽細胞に対するカドミウムの作用

鈴木信雄

〒927-0553 珠洲郡内浦町小木 金沢大学自然計測研究応用センター, 臨海実験施設

Nobuo Suzuki: The effects of cadmium on osteoclasts and osteoblasts in the scales of goldfish

魚のウロコには、破骨細胞と骨芽細胞とが共存し、I型コラーゲンも存在している。その中のカルシウムは、ハイドロキシアパタイトの形状をしている。したがってウロコは、ヒトの脊椎骨を薄く輪切りにしたような構造である。私は、このような構造を持つウロコを用いて培養系を開発した（前研究報告参照）。

カドミウムはイタイタイ病（骨軟化症）を引き起こす。その作用機構は、腎障害を経る経路が有力だが、骨に対する直接的な影響に関しては不明な点が多い。そこで本研究では、この培養系を用いて、カドミウムの骨細胞に対する直接的な作用を調べ、ウロコで発現している遺伝子も解析した。

キンギョのメス（体重30g前後）をMS222（Aldrich）で麻酔し、ウロコを採取した。そのウロコを1%の抗生物質を含むイーグルスの最少培地（大日本製薬）で2度洗浄し、その後カドミウム（ 10^{-15} ~ 10^{-5} M）を含む培地で培養（15°C, 6時間）した。培養後10%ホルマリンを含む0.05Mカコジル酸緩衝液（pH7.4）で固定し、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ（TRACP）及びアルカリフォスファターゼ（ALP）活性を測定した。

同様にキンギョのメス（体重30g前後）からウロコを採取し、カドミウム（ 10^{-7} M）を含む培地で培養した。培養後、ウロコを液体窒素で凍結し、アイソゲン（ニッポンジーン）によりトータルRNAを抽出した。その後、キット（宝酒造）によりcDNAを合成した。また本研究では、骨芽細胞の増殖及び分化に関係するエストロゲンの受容体（ER）とインシュリン様成長因子1（IGF-1）及び重金属の解毒に関与するタンパク質であるメタロチオネイン（MT）の発現をRT-PCRにより調べた。一方、残りのウロコを用いてTRACP及びALP活性を測定した。

さらに本研究では、骨芽細胞に対するカドミウムの長時間培養（96時間）による影響を調べるため、ウロコを前述の方法で調整し、ALP活性を測定した。

TRACP活性は、培養6時間で非常に高感度（ 10^{-13} ~ 10^{-5} M）でカドミウムに反応し、その活性を有意に低下させた（Fig. 1）。一方、骨芽細胞の活性の指標であるALP活性は6時間の培養では変化がなかった。また、ウロコの骨細胞で発現している遺伝子を解析すると、カドミウムの解毒に関係するタンパク質であるMT mRNAの発現が上昇していた。したがって、短時間の培養では、本タンパク質がカドミウムの解毒に寄与することが推測される（Fig. 2）。しかしながら、骨芽細胞の増殖や分化に関係するER及びIGF-1の発現が減少していたので（Fig. 2）、長期間の培養では、その活性が低下する可能性がある。実際にALP活性は、64及び96時間で低下した（Fig. 3）。

本研究において、ウロコの培養系を用いると、 10^{-13} Mのカドミウムを検出できることが判明した。原子吸光分光光度計を用いても、 10^{-10} Mまでしか測定できず、この系は非常に高感度である。さらに、64及び96時間の培養により、カドミウムは、骨芽細胞の活性を抑えていることが判明した。したがって、カドミウムはこれら両方の骨細胞に作用し、その活性を抑制し、骨代謝に悪影響を及ぼしていることがわかった。

以上のことから、ウロコはカドミウムの骨への直接的な作用を調べるにはよいモデルであり、今後、この系を用いて、さらに詳細なメカニズムを解明していきたい。

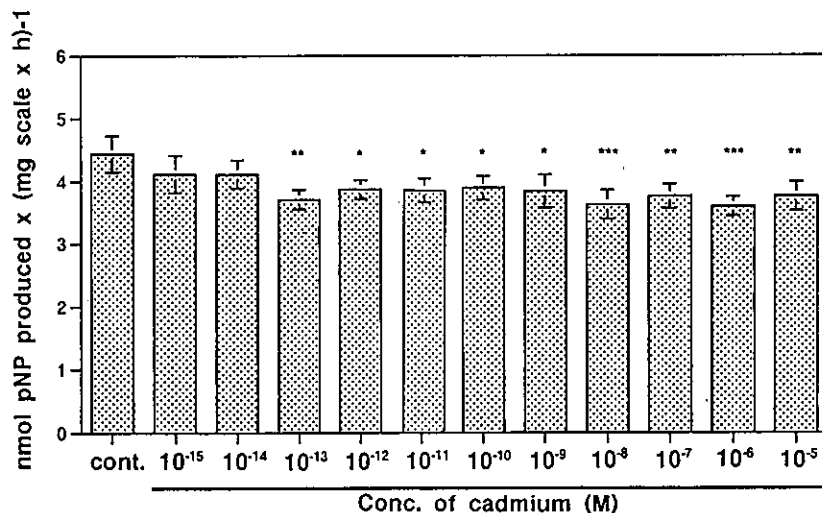


Fig. 1 Effect of cadmium on TRACP activity in the cultured scales at 6 h. *, **, *** indicate statistically significant differences at $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively, compared with the values in the control scales.

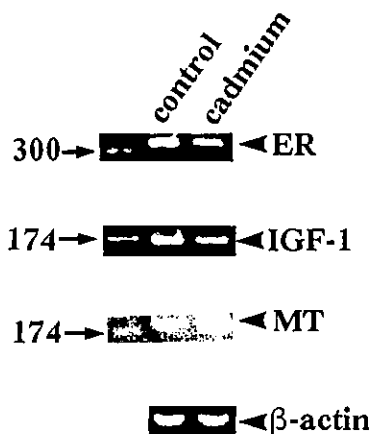


Fig. 2 Expression of *ER*, *IGF-1*, *MT* and β -*actin* mRNAs in the control and cadmium-treated scales of goldfish. Expression of *ER* and *IGF-1* mRNAs in the cadmium-treated scales were lower than those in the control scales while *MT* mRNA expression increased by cadmium-treatment. The PCR products of β -*actin* mRNA were equally amplified in both scales. Arrowheads indicate the PCR products of *ER* cDNA (327 bp), *IGF-1* cDNA (160 bp), *MT* cDNA (200 bp) and β -*actin* cDNA (200 bp). Arrow indicate respective size marker.

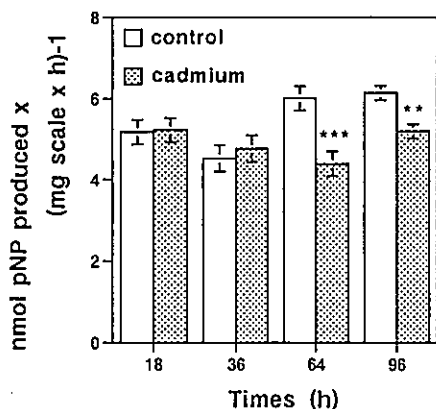


Fig. 3 Effect of cadmium on ALP activity in the cultured scales. ** *** indicate statistically significant differences at $P < 0.01$ and $P < 0.001$, compared with the values in the control scales.

謝辞

本研究は科学研究費，若手研究B（14740455）の援助により行われた。

真骨魚類の軟骨におけるカルシトニンmRNAの発現

金沢大学大学院自然科学研究科生命・地球学専攻 小林 大樹

〒927-0553 珠洲郡内浦町小木 金沢大学自然計測研究応用センター, 臨海実験施設

Daiki Kobayashi: Expression of *calcitonin* mRNA in the cartilage of teleosts

カルシトニンは32個のアミノ酸よりなるペプチドホルモンで、血中カルシウム濃度を低下させる。このホルモンは、哺乳類では甲状腺のC細胞より、それ以外の脊椎動物では鰹後腺と呼ばれる内分泌器官において産生される。血中カルシウム濃度を低下させる機構は以下の機序によると考えられている。すなわち、まず、カルシトニンは前破骨細胞に働いて破骨細胞への分化を阻止する結果、破骨細胞の急速な数の減少を起こす。また、骨表面に存在し、プロトンを分泌して骨組織を融解させている破骨細胞に働き、細胞骨格を切断させる結果、著しい形態変化を引き起こし、破骨細胞を骨表面から離脱させる。これらの結果として骨から血中へのカルシウムの溶出が抑制され、血中カルシウム濃度の低下がもたらされる。

これまで鰹後腺やC細胞以外の組織においてもカルシトニンは局所的に産生されており、例えば脳、消化管、肺等にカルシトニン免疫陽性細胞が検出されている。さらに、最近、キンギョにおいては、頭蓋軟骨にもカルシトニン免疫陽性反応を示す細胞が見い出された。一方、ヒトの骨芽細胞においてカルシトニンが発現し、骨芽細胞自体の増殖や分化に関係していることが報告されている。この結果は、血液中のカルシウム濃度を調節するというカルシトニンの全身的な作用とは別に、局所的に産生されたカルシトニンが周囲の細胞の機能や分化に重大な影響を与えていることを強く示唆している。特に、骨は全身的に働くカルシトニンの標的器官の1つなので、その骨自身がカルシトニンを産生することはこのホルモンの作用を考える上で興味深い。したがって、軟骨組織においても、カルシトニンが周囲の細胞にパラクライン的に働いて何らかの影響を与える可能性がある。そこで本研究では、真骨魚の軟骨が実際にカルシトニンを産生しているか否かを生化学的方法及び分子生物学的手法を用いて調べた。

本研究では、軟骨に存在するカルシトニン様物質の生化学的性質を調べるため、まずイワナ未成熟個体(体長約15cm)の頭蓋軟骨を直接可溶化してウェスタンブロットを行った。続いて、逆相の高速液体クロマトグラフィー(Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography: RP-HPLC)を用いて軟骨からカルシトニン様物質を分取し、その後ウェスタンブロットを行い、陽性物質の溶出位置を合成サケ・カルシトニンのそれと比較した。

次に、頭蓋骨のどの細胞でカルシトニンが産生されているかを調べるため、サケ・カルシトニンをコードする塩基配列をプローブに用いて*in situ* hybridization法により調べた。なおプローブは、サケ・カルシトニンcDNAのN末端から3'非翻訳領域を含む784bpに相当する部分をPCRで増幅し、それをTベクターに組み込み、Dig-RNA Labeling Kit(日本ロッシュ社)を用いてジゴキシンゲン標識のRNAプローブを作成した。材料には体長約5cmの放流直前のシロザケ稚魚を用いた。頭部のみを4% paraformaldehyde (PFA)で固定し、パラフィンに包埋し、4mmの厚さの組織切片とした。またプローブの有効性を確かめるために、その稚魚の鰹後腺も同様に処理して組織切片とした。

さらに軟骨組織からtotal RNAをキット(ニッポンジーン)により抽出し、RT-PCR(宝酒造)により、実際にカルシトニンをコードする塩基配列が増幅されるか否かを調べた。この時、N末端(5'-CCTTGGAC(T)AG(A/C)CCCA(G/T)(A/G)TC(C/T)AA(A/G)CG-3')及びC末端(5'-GT

TGCTCTCAGGCAGGCTGCGTTTCTTGCC-3') プライマーを合成し、カルシトニン cDNA断片を増幅した。反応条件は95°C-1min/35サイクル; 95°C-45sec, 55°C-30sec, 72°C-1min/35サイクル; 72°C-10min/1サイクルに設定した。Taq DNA polymeraseはGene Taq (ニッポンジーン) を用いた。PCR後、3% NuSieve GTG Agarose (FMC BioProducts) による電気泳動で目的とするカルシトニンcDNAが増幅されたか否かを調べた。電気泳動後、DNAサイズのマーカーとして用いたサケのカルシトニン遺伝子(151bp)と同じ位置に泳動されたバンドのみをゲルから切り出し、マイクロチューブに移した。それを加熱、溶解させ、フェノール抽出及びエタノール沈殿を行い、得られた沈殿をTE bufferに溶解した。この溶液のDNA断片を、プラスミド (Novagen pT7Blue T-Vector) 及びコンピテントセル (宝酒造) を用いてサブクローニングした。その試料はDNAシーケンサー (Perkin-Elmer Japan Applied Biosystems 373S型) を用いて塩基配列を決定した。

ポジティブコントロールとして用いたサケ・カルシトニン (3.5 kDa) の位置とほぼ等しい位置に、カルシトニンの抗体に反応するバンドが検出された。しかしながら、このバンドは反応が弱く、シャープではなかった。従って、サンプルにはカルシトニン以外の他のタンパク質等も混在していると考えられた。またRP-HPLCにより、その物質は、サケ・カルシトニンが溶出した画分と同じ時間に溶出した画分に含まれていることがわかり、その疎水的性質も似ていた。したがって、イワナの頭蓋軟骨に存在するカルシトニン様物質は生化学的にイワナのカルシトニンである可能性が非常に高い。

in situ hybridizationで用いるプローブの有効性を確かめるために、鰓後腺を染めた結果、anti-sense鎖では強いシグナルが得られ、sense鎖では全くシグナルは検出されなかった。また、シグナルは個々の細胞の核には見られず、細胞質のみが染色された。これらのことはこのプローブがカルシトニンmRNAの検出に有効であることを示している。そこでこのプローブを用いて、*in situ* hybridizationを行った。その結果、頭蓋骨の中で顛頂骨と前額骨において、anti-sense鎖でのみシグナルが検出された。さらに、染色された軟骨細胞を高倍率で見ると、核は染まっておらず、細胞質だけが染まっていた。またRT-PCRの結果、カルシトニンをコードする大きさと同じ大きさのcDNA断片が増幅された。そのシーケンスを調べると、鰓後腺で発現しているカルシトニン分子をコードするアミノ酸配列と同じ配列であった。以上の結果を考え併せると、シロザケの頭蓋軟骨においてカルシトニンmRNAが発現していると結論づけることができる。

これまで哺乳類の軟骨においてカルシトニン遺伝子が発現しているという報告はない。一方、ヒトの関節軟骨細胞へサケ・カルシトニンを投与するとプロテオグリカンやタイプIコラーゲンの産生を刺激しその維持に働くこと、またタイプIコラーゲンを分解するコラーゲナーゼの活性を抑制し軟骨基質の分解を抑えることが知られている。これらの結果は、カルシトニンが軟骨細胞とその基質の維持に働くことを示唆している。また、軟骨細胞にカルシトニンを作用させるとアルカリフォスファターゼ活性が上昇し、石灰化が促されることも知られている。この結果は、カルシトニンが軟骨細胞の維持ではなく、逆に組織としての終焉に向かわせることを意味している。本研究の結果は、少なくともイワナとシロザケにおいて頭蓋骨の軟骨細胞がカルシトニンのmRNAを発現させて実際にカルシトニン分子を産生していることを強く示唆している。軟骨細胞は自己分泌(autocrine)あるいは傍分泌(paracrine)によって、自身のあるいは周囲の軟骨細胞の成長や維持、さらには脱分化に働いている可能性がある。今後詳細な検討が必要である。

(本研究は、金沢大学大学院自然科学研究科生命・地球学専攻 小林 大樹君の修士論文の一環として行われた。)

オニオコゼにおけるカルシウムホメオスタシスの内分泌的調節 — 特にカルシトニンの役割に関して —

戒田典久^{1,2)}

¹〒927-0553 珠洲郡内浦町小木 金沢大学自然計測研究応用センター, 臨海実験施設; ²〒927-0435 鳳至郡能都町宇出津新港 石川県水産総合センター

Nonhisa Kaida: Endocrine regulation of calcium homeostasis in the stonefish, *Inimicus japonicus*: with special references to the role of calcitonin

真骨魚においてカルシトニン (CT) は、消化管前方部から血漿へ吸収されたカルシウムを調節するホルモンで、血漿カルシウム (Ca) 濃度の過度な上昇を抑制する役割を担っていることが示唆されている。しかしながら、これまでの実験では、尾部から採血しているため、採取された血液は動脈血と静脈血とが区別がつかない。血中 CT 濃度は、動脈血と静脈血との間に差が認められる可能性があり、両者の区別は重要である。またこれまでの研究では、血中 Ca 濃度が上昇し、それに伴って CT 濃度が上昇することは報告されているが、その後の Ca 濃度低下に伴う血中 CT 濃度の変化は調べられていない。さらに、血中 Ca 濃度が上昇する環境にいないキンギョや、広塩性のため海産魚を代表しているとは言えないウナギを実験に用いていたなど幾つかの欠点がある。以上のことから、本研究では、狭塩性の海産魚であるオニオコゼを用い、今までの欠点を克服するため、幾つかの工夫を施して実験をおこなった。

実験 1 では、オニオコゼ (体重 85g 前後、N=10) を用い、2-フェノキシエタノールで麻酔し、その後動脈球にカニューレーションを行った。イニシャルの採血を行った後、高 Ca 液 (コンソメ溶液に 1.25M の CaCl₂ を添加した溶液) を胃へカニューレを用いて直接投与 (体重 100g 当たり 1ml) し、同一個体から動脈血のみを採取した。なお、採血は投与 1, 3, 9, 33 時間後に行った。血液は遠心により分離され、その血漿を用いて Ca 濃度と CT 濃度の変化を調べた。血漿 Ca 濃度は、カルシウム-C テストワコー (WAKO) を用いた OCPC 法で測定し、CT 濃度は、Calcitonin (Salmon) Enzyme Immunoassay Kit: High Sensitivity (PENINSURA LABORATORIES, INC.) を用いて測定した。

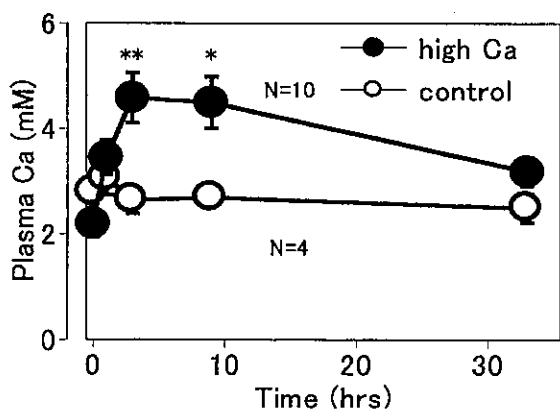


Fig. 1 Plasma Ca levels in stonefish administered a high-Ca solution (high Ca) or a consommé solution (control) into the stomach at 0, 1, 3, 9, and 33 hrs after the treatments. The values are shown as the mean \pm SE. Asterisks (*, **) exhibit statistical differences ($P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively) from the control values.

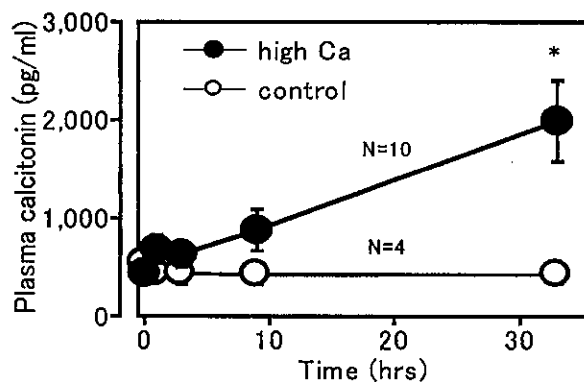


Fig. 2 Plasma calcitonin levels in stonefish administered a high-Ca solution (high Ca) or a consommé solution (control) into the stomach at 0, 1, 3, 9, and 33 hrs after the treatments. The values are shown as the mean \pm SE. Asterisks (*) indicate a statistical difference ($P < 0.05$) from the control values.

一方、実験2ではオニオコゼ(体重85g前後、N=11)を用い、実験1と同様にして動脈球にカニューレを挿入し、体重100g当たり0.5mlの割合で胃へカニューレを通して投与した。実験2では投与前、9、33、81時間後に採血し、実験1と同様にして血漿Ca及びCT濃度を測定した。

実験1のCa及びCT濃度の変化をFig.1及び2に示す。血漿Ca濃度は、高Ca液投与前は2.2mMだったが、投与1時間後と3時間後に上昇し、それぞれ3.5mMと4.6mM ($P<0.01$) になった。投与9時間後のCa濃度は、投与3時間後と変化がなく4.5mM ($P<0.05$) だった。投与33時間後に血漿Ca濃度は低下し、3.2mMになった。この値は、投与前の値と統計的に有意差がなかった。それに対し、対照群の血漿Ca濃度は、2.8mMで、この値は実験時間を通してほとんど変わらず、有意な変化は見られなかった。血漿CT濃度は、高Ca液投与前に440.2pg/mlだったが、投与1時間後と3時間後に、それぞれ684.8pg/mlと631.9pg/mlへとわずかに変化した。さらに、投与9時間後に上昇し、878.5pg/mlになり、投与33時間後でも上昇を続け、1993.3pg/mlに達した ($P<0.05$)。対照群の血漿CT濃度は、541.8pg/mlで、この値は実験時間を通してほとんどかわらず、有意な変化は見られなかった。

Fig.3に実験2の結果を示す。実験2において、高Ca液投与33時間後までの血漿Ca濃度の変化は、実験1の結果と同じ傾向を示した。投与前の血漿Ca濃度は、3.0mMだったが、投与9時間後に有意に上昇し、4.7mMになった ($P<0.01$)。その後、投与33時間後に3.8mMに低下したが、投与前の濃度より有意に高い値だった ($P<0.05$)。

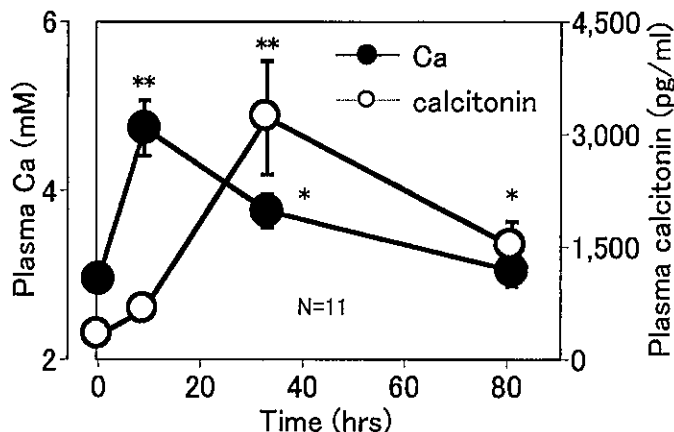


Fig. 3 Plasma Ca and calcitonin levels in stonefish administered a high-Ca solution into the stomach at 0, 9, 33, and 81 hrs after the treatment.

The values are shown as the mean \pm SE. Asterisks (*,**) indicate statistical differences ($P<0.05$, $P<0.01$, respectively) from the initial value.

しかしながら、81時間後に血漿Ca濃度は、さらに低下して3.1mMになり、投与前の値と有意差は見られなくなった。血漿CT濃度の変化も、投与33時間後まで、実験1で得られた結果とほぼ同じで、血漿CT濃度は、高Ca液投与前と投与9時間後に、それぞれ320.7pg/mlと685.2pg/mlであった。投与33時間後は、9時間後の値よりさらに上昇を続け、3221.8pg/ml ($P<0.01$) になり、投与81時間後には、投与33時間後のレベルの約半分にまで低下し、1508.9pg/mlになった ($P<0.05$)。

これらの事実は、オニオコゼにおいて、鰹後腺が血漿Ca濃度の上昇と低下に反応して生理的にCTを分泌し、また分泌を停止したことを示しており、海産真骨魚においてCTは、血漿Ca濃度の上昇に伴って分泌され、血漿Ca値を生理的レベルに抑える役割を担っていることを強く示唆している。

(本研究は、金沢大学大学院自然科学研究科生命科学専攻【社会人特別選抜：石川県水産総合センター】戒田典久君の博士論文の一環として行われた。)

【構成員】

1) 職員

教授（施設長）	笹山雄一 (sasayama@sweet.ocn.ne.jp) 理学博士 専攻 生物多様性学、比較生理学
助手	鈴木信雄 (nobuo@kenroku.kanazawa-u.ac.jp) 博士（理学） 専攻 比較内分泌学
技術専門職員	又多政博 (matada@sweet.ocn.ne.jp) 専門 海産無脊椎動物一般
事務補佐員	曾良美智子(msora@sweet.ocn.ne.jp)

2) 学生

博士後期課程3年 [社会人特別選抜：石川県水産総合センター]
戒田典久 (kaiser@nanao.nsk.ne.jp)

博士前期課程2年
小林大樹 (daiki@suzu2.suzu.or.jp)

博士前期課程1年
小木曾正造 (syozo_o@sweet.ocn.ne.jp)

金沢大学自然計測応用研究センター
臨海実験施設
〒927-0553 石川県珠洲郡内浦町小木ム 4-1
Tel (0768)-74-1151; Fax (0768)-74-1644
Noto Marine Laboratory, Kanazawa University
Ogi, Uchiura, Ishikawa 927-0553, Japan
